



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08029422 A**(43) Date of publication of application: **02 . 02 . 96**

(51) Int. Cl.

G01N 33/543
G01N 33/543
G01N 33/52

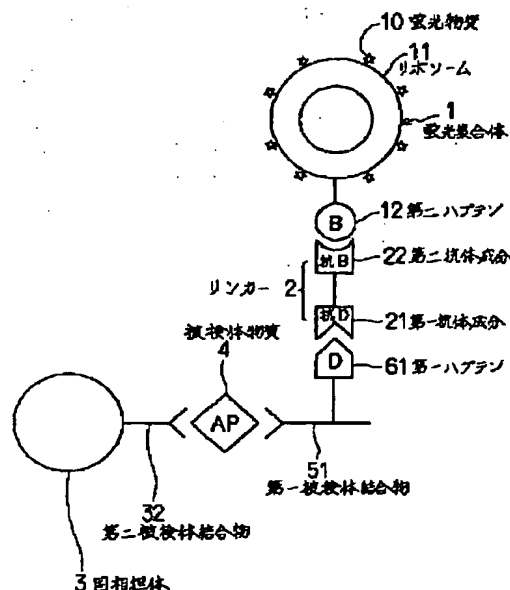
(21) Application number: **06183852**(22) Date of filing: **12 . 07 . 94**(71) Applicant: **AISIN SEIKI CO LTD**

(72) Inventor: **FUJITA SATOSHI**
KAGIYAMA NAOTO
MOMIYAMA MASAYOSHI
KONDO YASUMITSU

(54) DETECTING METHOD BY USING FLUORESCENT AGGREGATE**(57) Abstract:**

PURPOSE: To provide a specimen substance detecting method which excellent detecting sensitivity and which uses a fluorescent aggregate.

CONSTITUTION: A specimen substance 4 such as protein is fixed to a solid phase carrier 3, and a linker 2 is joined to the specimen substance 4 by antigen antibody reaction. Next, a fluorescent aggregate 1 is joined to the linker 2 by antigen antibody reaction, and fluorescence emitted from the fluorescent aggregate 1 is detected. It is desirable that the linker 2 is composed of a first antibody component 21 to be specifically joined to the specimen substance 4 and a second antibody component 22 to be specifically joined to the fluorescent aggregate 1. The linker 2 can be joined to the specimen substance 4 through a first hapten 61 joined to the specimen substance 4. The specimen substance 4 can be specifically joined to the first hapten 61 by a first specimen joining material 51. The linker 2 can be joined through a second hapten 12 joined to the fluorescent aggregate 1.



COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 7 5			
	5 1 5 A			
33/52	C			

審査請求 未請求 請求項の数15 F D (全 10 頁)

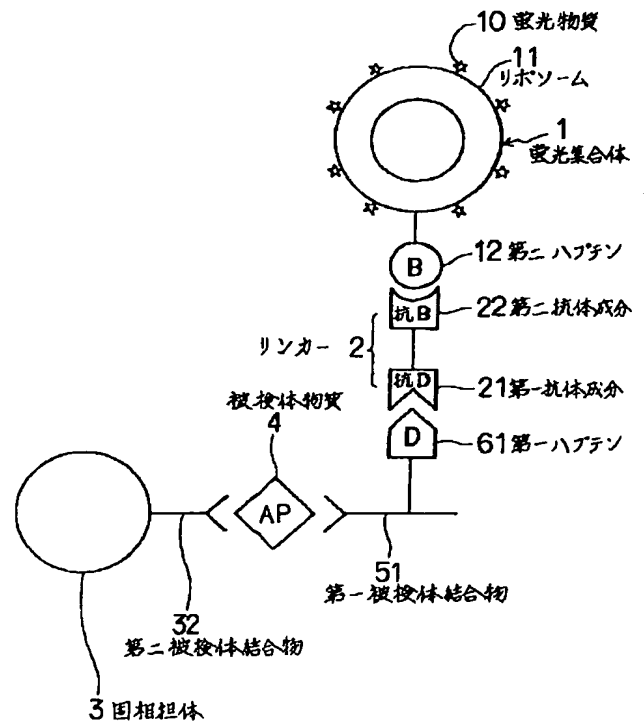
(21)出願番号	特願平6-183852	(71)出願人	000000011 アイシン精機株式会社 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地
(22)出願日	平成6年(1994)7月12日	(72)発明者	藤田 聡 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地 アイシン精機株式会社内
		(72)発明者	鍵山 直人 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地 アイシン精機株式会社内
		(72)発明者	粉山 政慶 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地 アイシン精機株式会社内
		(74)代理人	弁理士 高橋 祥泰
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 蛍光集合体を用いた検出方法

(57)【要約】

【目的】 優れた検出感度を示す、蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法を提供すること。

【構成】 固相担体3に、タンパク質等の被検体物質4を固定し、該被検体物質4に抗原抗体反応によりリンカー2を結合させる。次に、リンカー2に抗原抗体反応により蛍光集合体1を結合させ、蛍光集合体1から発する蛍光を検出する。リンカー2は、被検体物質4に特異的に結合する第一抗体成分21と、蛍光集合体1に特異的に結合する第二抗体成分22とよりなることが好ましい。リンカー2は、被検体物質4に結合した第一ハプテン61を介して被検体物質4と結合することができる。被検体物質4は、第一被検体結合物51により第一ハプテン61と特異的に結合させることができる。また、リンカー2は、蛍光集合体1に結合した第二ハプテン12を介して結合することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 固相担体に抗原性を有する被検体物質を固定し、該被検体物質に抗原抗体反応によりリンカーを結合させ、該リンカーに抗原抗体反応により蛍光集合体を結合させ、上記蛍光集合体から発する蛍光を検出する、蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法であって、上記リンカーは、上記被検体物質に特異的に結合する第一抗体成分と、蛍光集合体に特異的に結合する第二抗体成分とからなることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 2】 請求項 1 において、上記リンカーは、被検体物質に結合した第一ハプテンを介して、上記被検体物質と特異的に結合していることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 3】 請求項 2 において、上記第一ハプテンは、被検体物質と抗原抗体反応により結合する第一被検体結合物を介して、上記被検体物質と特異的に結合していることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれか一項において、上記リンカーは、蛍光集合体に結合した第二ハプテンを介して、上記蛍光集合体と結合していることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 5】 請求項 2～4 のいずれか一項において、上記第一ハプテンは、ビオチン、ディゴキシゲニン、ジニトロフェノール、トリニトロフェノール、フルオレセイン、テトラメチルローダミン B イソチオシアネート、ローダミン、テキサスレッド、ルシフェル イエロー、4, 4-ジフルオロ-5, 7-ジメチル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオニル、7-ニトロベンズ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール-4-イル、ダンシル、クマリン、DNA, RNA, 又はウイルスのいずれか一種であることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 6】 請求項 4, 5 のいずれか一項において、上記第二ハプテンは、ビオチン、ディゴキシゲニン、ジニトロフェノール、トリニトロフェノール、フルオレセイン、テトラメチルローダミン B イソチオシアネート、ローダミン、テキサスレッド、ルシフェル イエロー、4, 4-ジフルオロ-5, 7-ジメチル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオニル、7-ニトロベンズ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール-4-イル、ダンシル、クマリン、DNA, RNA, 又はウイルスのいずれか一種であることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 7】 請求項 1～6 のいずれか一項において、上記第一抗体成分と第二抗体成分とは、チオール基とマレイミド基とにより結合されていることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 8】 請求項 1～7 のいずれか一項において、

上記蛍光集合体は、複数の蛍光物質を取り込んだリポソームであることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 9】 請求項 8 において、上記リポソームに取り込まれた蛍光物質は、リポソームと共有結合により結合している共有結合性蛍光物質、又はリポソームの中に封入されている非共有結合性蛍光物質であることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 10】 請求項 9 において、上記共有結合性蛍光物質は、クマリン骨格を有する化合物、ナフタレン骨格を有する化合物、フルオレセイン骨格を有する化合物、ペリレン骨格を有する化合物、ピレン骨格を有する化合物、アントラセン骨格を有する化合物、及びローダミン骨格を有する化合物のグループから選ばれる一種又は二種以上であることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 11】 請求項 9 において、上記非共有結合性蛍光物質は、4-メチルウンベリフェロン、7-ヒドロキシ-4-ビフェニルウンベリフェロン、3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、2-フェニルアニリド、3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸-2, 4-ジメチルアニリド、6-ブロモ-2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸-2-メチルアニリド、3-ヒドロキシ-2-アントラノイック酸、2-メチルアニリド、ピレン、フルオレセイン、ペリレン、ローダミン、テキサスレッド、及び DNA 結合性蛍光物質のグループから選ばれる一種又は二種以上であることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 12】 請求項 1～7 のいずれか一項において、上記蛍光集合体は、複数の蛍光物質を結合したポリペプチドであることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 13】 請求項 1～12 のいずれか一項において、上記固相担体は、ビーズ、プラスチックプレート、ガラスプレート、ゲル、又はメンブレンのいずれかであることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 14】 請求項 1～13 のいずれか一項において、上記被検体物質は、該被検体物質に特異的に結合する第二被検体結合物を介して、上記固相担体に固定することを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【請求項 15】 請求項 1～14 のいずれか一項において、上記被検体物質は、組織細胞、ウイルス、核酸、又はタンパク質のいずれかであることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法であって、特にメンブレンフィルタ

を利用して、又は生体組織内において、被検体物質を感度良く検出することができる方法に関する。

【0002】

【従来技術】核酸やタンパク等を検出する場合、放射性同位体元素（R I）方式に匹敵する系ではシグナル発生物を単独で結合させては感度が不十分なので、ハプテンなど抗原性を有するものを結合させ、それに対する抗体に酵素など化学増幅させられる物質により最終的にシグナルを発生させて検出するシステムが一般的である。

【0003】現在メンブレンフィルタ上で検出する非R I方式で一番優れているのは、文献（Bio. Chem. Hoppe-Seyler, 371, 953-965, 1990）にみられる、ディゴキシゲニンを用いた検出方法であろう。しかし、それでも、酵素の結合反応等の操作が煩雑であるだけでなく、酵素反応によるシグナルの検出に数時間以上を要するため、簡単でかつ迅速に検出できる方法の開発が望まれている。

【0004】従来、放射性物質による標識法を用いないで核酸等の被検体物質を検出する方法としては、リポソームを蛍光物質のキャリアとして用いることにより被検体物質を検出する方法が、Youngらにより報告されている（J. Immunol. Methods, 28, 58, 1979）。

【0005】かかる検出方法は、図7に示すごとく、蛍光物質95を封入したリポソーム93を調製するとともに、抗体成分94を結合させる。次に、このリポソーム93に、蛋白質等の抗原性を有する被検体物質91を抗原抗体反応により直接結合させる。次に、被検体物質91に結合しなかったリポソーム93を洗浄により除去する。次に、リポソーム93を界面活性剤により破壊し、蛍光物質95を反応溶液中に浮遊させ、蛍光物質95の蛍光を検出する。これにより、被検体物質を検出することができる。

【0006】

【解決しようとする課題】しかしながら、上記従来法においては、リポソーム93と被検体物質91との結合が不安定である。そのため、一旦結合したリポソーム93が、洗浄時に未反応のリポソームとともに除去される。それ故、大量の蛍光物質95を反応溶液中に浮遊させることができず、検出感度が低い。また、上記従来法においては、リポソームを用いて蛍光物質を被検体物質に結合させた後、リポソームを破壊して蛍光物質を取り出している。そのため、反応溶液により蛍光物質の濃度が希釈され、蛍光強度が弱く、検出感度が低くなる。

【0007】更に、蛍光物質を封入したリポソームを用いて、メンブレンフィルタ上で被検体物質を検出する場合には、被検体物質がメンブレンのメッシュの中に埋もれたとき、大きな物質のリポソームはリポソーム自身の立体障害によりメンブレンの表面で止まってしまう。そのため、リポソームに結合した抗体成分がメッシュの中

の被検体物質に届かない場合がある。

【0008】また、生体組織中の被検体物質を検出する場合にも、大きな物質のリポソームが生体組織中の他の物質に邪魔されて、リポソームの表面に付着した抗体が、被検体物質に届かない場合がある。従って、メンブレンフィルタ上及び生体組織内で被検体物質を検出する場合には、特に検出感度が低い。本発明はかかる従来の問題点を鑑み、優れた検出感度を発揮する、蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法を提供しようとするものである。

【0009】

【課題の解決手段】本発明は、固相担体に抗原性を有する被検体物質を固定し、該被検体物質に抗原抗体反応によりリンカーを結合させ、該リンカーに抗原抗体反応により蛍光集合体を結合させ、上記蛍光集合体から発する蛍光を検出する、蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法であって、上記リンカーは、上記被検体物質に特異的に結合する第一抗体成分と、蛍光集合体に特異的に結合する第二抗体成分とからなることを特徴とする蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方法にある。

【0010】本発明において最も注目すべきことは、被検体物質と蛍光集合体とを、2つの抗体成分を有するリンカーによりつなぎ合わせた状態となして検出していることである。本発明において、上記リンカーは、被検体物質と蛍光集合体とを1対1で結合させる仲介物質である。このリンカーは、第一被検体結合物に特異的に結合する第一抗体成分と、蛍光集合体に特異的に結合する第二抗体成分とからなる。これにより、第一被検体結合物と蛍光集合体とが、リンカーの別々の活性部位に結合するため、第一被検体結合物と同数の、蛍光強度が高い蛍光集合体を結合することができ、検出感度が高い。

【0011】上記リンカーの第一抗体成分は、第一被検体結合物に結合した第一ハプテンを介して、上記第一被検体結合物と特異的に結合することができる。上記被検体物質が抗原性物質ではないため、リンカーの第一抗体成分と直接結合することができないときには、上記第一ハプテンを、被検体物質と特異的に結合する第一被検体結合物を介して、上記被検体物質と特異的に結合することができる。もちろん、被検体物質が抗原性を有する物質であっても、第一ハプテンを、上記第一被検体結合物を介して、上記被検体物質と特異的に結合することができる。上記第一被検体結合物は、第一ハプテンを被検体物質に結合させるものであれば特に限定しない。例えば被検体物質がアルカリホスファターゼである場合には、抗アルカリホスファターゼ抗体を第一被検体結合物として用いることができる。

【0012】上記リンカーの第一抗体成分は、上記第一ハプテンと抗原抗体反応により結合するものであれば特に限定しない。かかる第一ハプテンとしては、例えば、biotin（ビオチン）、digoxigenin

(ディゴキシゲニン), dinitrophenol (DNP) (ジニトロフェノール), trinitrophenol (TNP) (トリニトロフェノール), fluorescein (フルオレセイン), tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC) (テトラメチルローダミン B イソチオシアネート), rhodamine (ローダミン), Texas Red (テキサス レッド), Lucifer Yellow (ルシフェル イエロー), 4, 4-difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-propionyl (BO DIPY) (4, 4-ジフルオロ-5, 7-ジメチル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオニル), 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl (NBD) (7-ニトロベンズ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール-4-イル), (O-11-(5-dimethylamino naphthalene-1-sulfonyl) amino) undecyl (dansyl) (ダンシル), coumarin (クマリン), DNA, RNA, 又はウイルス等を用いることができる。

【0013】例えば、第一ハプテンがビオチンの場合には、上記第一抗体成分としては抗ビオチン抗体又はストレプトアビジンを用いることができる。ストレプトアビジンは、抗ビオチン抗体と同様にビオチンと特異的に結合する物質であるため、ビオチンの抗体として働く物質である。また、第一ハプテンがディゴキシゲニンの場合には、上記第一抗体成分としては抗ディゴキシゲニン抗体を用いることができる。第一ハプテンがDNPの場合には、上記第一抗体成分としては抗DNP抗体を用いることができる。

【0014】また、上記リンカーの第二抗体成分は、蛍光集合体に結合した第二ハプテンを介して、上記蛍光集合体と結合することができる。上記第二抗体成分は、抗原抗体反応により上記第二ハプテンと結合するものであれば特に限定しない。かかる第二ハプテンとしては、例えば、biotin (ビオチン), digoxigenin (ディゴキシゲニン), dinitrophenol (DNP) (ジニトロフェノール), trinitrophenol (TNP) (トリニトロフェノール), fluorescein (フルオレセイン), tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC) (テトラメチルローダミン B イソチオシアネート), rhodamine (ローダミン), Texas Red (テキサス レッド), Lucifer Yellow (ルシフェル イエロー), 4, 4-difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-propionyl (BO

DIPY) (4, 4-ジフルオロ-5, 7-ジメチル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオニル), 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl (NBD) (7-ニトロベンズ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール-4-イル), (O-11-(5-dimethylamino naphthalene-1-sulfonyl) amino) undecyl (dansyl) (ダンシル), coumarin (クマリン), DNA, RNA, 又はウイルス等を用いることができる。

【0015】例えば、第二ハプテンがディゴキシゲニンの場合には、上記第二抗体成分としては抗ディゴキシゲニン抗体を用いることができる。第二ハプテンがDNPの場合には、上記第二抗体成分としては抗DNP抗体を用いることができる。また、第二ハプテンがビオチンの場合には、上記第二抗体成分としては抗ビオチン抗体又はストレプトアビジンを用いることができる。上記第一抗体成分と第二抗体成分とは互いに同種のものを用いることもできるが、検出感度向上のため異種同志のものを

用いることが好ましい。

【0016】上記リンカーの形成方法としては、例えば第一抗体成分及び第二抗体成分の非活性部位を切断又は修飾し、その切断又は修飾部位同志を化合反応により結合する方法がある。具体的には、例えば、第一抗体成分の非活性部位をマレイミド化し、また、第二抗体成分の非活性部位をペプシン等の酵素反応により切断して、その末端にチオール基を露出させ、上記第一抗体成分と第二抗体成分とを図3、図4に示すごとく結合することができる。同図中において、「Fab」はアミノ基末端の第一抗体成分又は第二抗体成分を意味し、「Fab'」はチオール基末端の第一抗体成分又は第二抗体成分を意味する。

【0017】上記蛍光集合体としては、複数の蛍光物質を含むリポソームを用いることが好ましい。リポソームは脂質人工膜の一種で、二分子膜よりなる閉鎖小胞である。リポソームには多数の蛍光物質を取り込むことができ、蛍光強度を高くすることができる。また、蛍光物質は、一般に、疎水性雰囲気下で蛍光強度が数十倍増加する性質を有する。また、蛍光物質は水溶液によく溶ける。そのため、蛍光物質は、特に親水性と疎水性の両面をもつリポソームに取り込まれることにより、蛍光強度が50~200倍増幅される。それ故、被検体物質の検出感度が向上する。

【0018】また、リポソームは、親水性物質を膜内水相に、疎水性物質を分子膜の中に取り込むことができる。また、リポソームには、直接種々の物質を結合させることができる。このため、リポソームには、利用されにくかった物質も容易に取り込むことができ、蛍光物質の選択幅が広がり、多色蛍光検出法にも応用できる。上記リポソームとしては、例えば3000~4000個の

リン脂質により形成されたものがある。

【0019】上記リポソームに含まれる蛍光物質は、リポソームと共有結合により結合している共有結合性蛍光物質、又はリポソームの中に封入されている非共有結合性蛍光物質等である。この中、蛍光物質は上記共有結合性蛍光物質であることが好ましい。これにより、蛍光集合体の蛍光強度が高くなり、被検体物質を感度良く検出することができる。その理由は、上記共有結合性蛍光物質はリポソームの表面に共有結合により結合しているため、多量の共有結合性蛍光物質を結合させた場合にも、共有結合性蛍光物質自身が強い蛍光を発し続けるからである。

【0020】また、非共有結合性蛍光物質は、リポソームを破壊することにより更に高感度に被検体物質を検出できる。その理由は、蛍光集合体と被検体物質とはリンカーにより確実に結合しているため、多量の非共有結合性蛍光物質を被検体物質に結合することができる。故に、非共有結合性蛍光物質が高濃度に存在することによる非共有結合性蛍光物質自身の蛍光が減少しても、リポソームを破壊することにより、従来よりも高濃度の非共有結合性蛍光物質を反応溶液中に放出することができ、その結果、従来よりも高感度に被検体物質を検出することができる。

【0021】上記共有結合性蛍光物質はリポソームを構成する分子（例えば、リン脂質）と共有結合により結合するため、その分子数が有する反応基の数と同程度まで、リポソームに結合させることができる。一方、1つのリポソームに結合する共有結合性蛍光物質が10個未満の場合には、蛍光集合体の蛍光強度が弱くなり、被検体物質の検出感度が低下するおそれがある。

【0022】上記共有結合性蛍光物質としては、例えば、クマリン骨格を有する化合物、ナフタレン骨格を有する化合物、フルオレセイン骨格を有する化合物、ペリレン骨格を有する化合物、ピレン骨格を有する化合物、アントラセン骨格を有する化合物、及びローダミン骨格を有する化合物等がある。

【0023】クマリン骨格を有する化合物としては、4-メチルウンベリフェリル ホスホコリン、7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸-オクタデシルエステル等を用いることができる。ナフタレン骨格を有する化合物としては、NBD標識ホスファチジルエタノールアミン、Dansyl標識ホスファチジルエタノールアミン等を用いることができる。

【0024】フルオレセイン骨格を有する化合物としては、フルオレセイン標識ホスファチジルエタノールアミン等を用いることができる。ペリレン骨格を有する化合物としては、1-ヘキサデカノイル-2-（3-ペリレンドデカノイル）-sn-グリセロール-3-ホスホコリン等を用いることができる。

【0025】ピレン骨格を有する化合物としては、1、

2-ビス（1-ピレンデカノイル）-sn-グリセロール-3-ホスホコリン、12-（1-ピレンドデカノイル）ホスホコリン等を用いることができる。アントラセン骨格を有する化合物としては、12-（9-アンスロイロキシ）-ステアリン酸等を用いることができる。ローダミン骨格を有する化合物としては、ローダミン標識ホスファチジルエタノールアミン等を用いることができる。

【0026】上記非共有結合性蛍光物質は、リポソームを構成する分子に結合しているのではなく、リポソームの膜内水相又は疎水性の分子膜の中に取り込まれる。1個のリポソームに取り込まれる非共有結合性蛍光物質の数は、10～10000であることが好ましい。10未満の場合には、蛍光集合体の蛍光強度が弱く、被検体物質の検出感度が低下するおそれがある。一方、10000を越える場合には、リポソームの水溶性が低下したり、サイズが大きくなるので立体障害がかなり大きくなるおそれがある。

【0027】上記非共有結合性蛍光物質としては、4-メチルウンベリフェロン、7-ヒドロキシ-4-ビフェニル-ウンベリフェロン、3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸-2-フェニルアニリド、3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸-2, 4-ジメチルアニリド、6-プロモ-2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸-2-メチルアニリド、3-ヒドロキシ-2-アントラノイック酸-2-メチルアニリド、ピレン、フルオレセイン、ペリレン、ローダミン、テキサスレッド、又はDNA結合性蛍光物質等がある。DNA結合性蛍光物質としては、Hoechst 33258（ヘキスト・ジャパン社製）、DAPI（SIGMA社製）、エチジウム ブロミド等を用いることができる。

【0028】上記蛍光集合体としては、複数の上記蛍光物質を結合したポリペプチドを用いることもできる。上記ポリペプチドの分子量は、1万～50万であり、その側鎖上には複数の蛍光物質が結合している。かかるポリペプチドとしては、例えば、ポリ-L-リジン等がある。

【0029】ポリペプチドには、100～10000個の蛍光物質を結合させることが好ましい。100個未満の場合には、蛍光強度が弱くなり、被検体物質の検出感度が低下するおそれがある。一方、10000個を越える場合には、ポリペプチド自体の重合度が高くなり、ポリペプチドの水溶性が低下するおそれがある。

【0030】上記固相担体は、被検体物質を一定の場所に固定できるものであれば特に限定しないが、例えば、ビーズ、プラスチックプレート、ガラスプレート、ゲル、又は、メンブレン等を用いることができる。上記固相担体は、被検体物質に特異的に結合する第二被検体結合物を介して、上記被検体物質を固定することができる。例えば、被検体物質がアルカリホスファターゼの場

合には、第二被検体結合物は、抗アルカリホスファターゼ抗体である。

【0031】上記被検体物質は、抗原性を有する物質であれば特に限定しないが、例えば、組織細胞、ウイルス、核酸、又はタンパク質がある。

【0032】

【作用及び効果】本発明の被検体物質の検出方法においては、被検体物質と蛍光集合体を、リンカーによりつなぎ合わせた状態となして検出している。リンカーは、被検体物質及び蛍光集合体に対し、抗原抗体反応により結合する。そのため、リンカーは、被検体物質と蛍光集合体との間の結合安定性が高い。それ故、被検体物質は、リンカーを介して蛍光集合体に確実に安定して結合する。

【0033】また、このリンカーは、第一被検体結合物に特異的に結合する第一抗体成分と、蛍光集合体に特異的に結合する第二抗体成分とからなる。そのため、第一被検体結合物と蛍光集合体とが、リンカーの別々の活性部位に結合するため、第一被検体結合物と同数の、蛍光強度が高い蛍光集合体を結合することができ、検出感度が高い。

【0034】また、蛍光集合体は多数の蛍光物質の集合体であり、蛍光強度が高いため、1つの蛍光集合体を被検体物質に結合させるだけで、十分な蛍光強度が得られ、被検体物質を十分に検出することができる。

【0035】更に、従来法のように一旦蛍光集合体を被検体物質に結合した後、蛍光集合体を破壊することなく、そのまま蛍光集合体の蛍光を検出することができる。そのため、蛍光集合体は、反応溶液により希釈されることなく、そのまま1つの強い輝点として検出することができる。

【0036】また、被検体物質と蛍光集合体とはリンカーを介在させて結合している。そのため、被検体物質と蛍光集合体との間はその距離が長くなっても確実に結合することになる。このため、メンブレンフィルタ、ニトセルロースフィルタ等のフィルタを用いて被検体物質を検出する場合に、メッシュの中に被検体物質が埋もれてしまっても、該被検体物質は、フィルタ表面に存在する蛍光集合体と確実に結合することができる。

【0037】また、生体組織中において被検体物質を検出する場合に、他の物質の存在により被検体物質と蛍光集合体との距離が近接できないときにも、該被検体物質は、離れて存在する蛍光集合体と確実に結合することができる。従って、フィルタを用いた場合、及び生体組織中においても、蛍光集合体の立体障害の問題を回避することができ、感度良く、被検体物質を検出することができる。更に、本発明の検出方法によれば、被検体物質を簡単に、かつ短時間で検出することができる。

【0038】上記のごとく、本発明によれば、優れた検出感度を示す、蛍光集合体を用いた被検体物質の検出方

法を提供することができる。

【0039】

【実施例】

実施例 1

本発明の実施例にかかる被検体物質の検出方法について、図1、図2を用いて説明する。本例は、被検体物質としてのアルカリホスファターゼを検出する方法である。本例の検出方法の概要について説明すると、図1に示すごとく、まず、第一抗体成分21と第二抗体成分22とからなるリンカー2を調製する。また、蛍光物質10をリボソーム11に封入した蛍光集合体1を調製する。この蛍光集合体1には、第二ハプテン12を結合させておく。

【0040】次に、固相担体3に、第二被検体結合物32を介して、被検体物質4を固定する。次いで、被検体物質4に、第一被検体結合物51を結合させる。この第一被検体結合物51には予め第一ハプテン61が結合している。次に、第一ハプテン61に抗原抗体反応により、上記のリンカー2を介して、蛍光集合体1の第二ハプテン12を結合させる。その後、蛍光集合体1から発する蛍光を検出する。

【0041】本例においては、固相担体3はビーズであり、第一被検体結合物51及び第二被検体結合物32は抗アルカリホスファターゼ抗体である。また、第一ハプテン61はディゴキシゲニン、第一抗体成分21は抗ディゴキシゲニン抗体、第二ハプテン12はビオチン、第二抗体成分22は抗ビオチン抗体である。蛍光集合体1は、共有結合性蛍光物質としてのローダミンを結合させたリボソーム11である。

【0042】以下、上記アルカリホスファターゼの検出方法について詳説する。

(1) リンカーの調製

① 抗ディゴキシゲニン抗体の修飾

抗ディゴキシゲニン抗体(ベーリンガー社製)2mgを、0.1Mリン酸緩衝液(1mM MgCl₂, 0.1M ZnCl₂, pH7)300μlに溶解し、さらに、SMCC(Succinimidy-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate/DMSO, 5mg/250μl)を10μl加え、30℃で30分間静置し、遠心後、上清をSephadex G-25(カラムサイズ:1.0×15cm:0.1Mリン酸緩衝液, 1mM MgCl₂, 0.1M ZnCl₂, pH7)でゲルろ過により脱塩した。高分子の溶出成分を集め、遠心限外ろ過で200μlに濃縮し、マレイミド化抗ディゴキシゲニン抗体溶液とした。

【0043】② 抗ビオチン抗体の修飾

抗ビオチン抗体(ベクター社製)3mgを0.1M酢酸-NaOH緩衝液(pH4.5)で透析し、ペプシン(シグマ社製)0.2mgを加え、37℃で16時間静

置した。沈澱を遠心分離により除去し、その上清をゲルろ過した（ウルトロゲルAcA44, カラムサイズ: 1.0×45cm, 緩衝液: 0.1M リン酸 pH: 7)。

【0044】抗体蛋白の溶出画分を集め、硫酸アンモニウムを濃度0.66g/ml (重量%)で加え、抗体を沈澱させた(塩析)。遠心分離後、沈澱をリン酸緩衝液(0.1mol pH: 6) 0.4mlに溶解し、防腐のため 0.1g/mlアジ化ナトリウム4μl加え、F(ab')₂フラグメント溶液とした。

【0045】F(ab')₂溶液に、0.1M メルカプトエチルアミン塩酸塩(0.1Mリン酸緩衝液 pH: 6, 5mM EDTA) 50μlを加え、37℃で90分静置した。ゲルろ過後、可変部単体(Fab')画分を集め、塩析により0.4mlに濃縮し、チオール化抗ビオチン抗体溶液とした。

【0046】③ 抗ディゴキシゲニン抗体と抗ビオチン抗体との結合反応

①のマレイミド化抗ディゴキシゲニン抗体溶液と②のチオール化抗ビオチン抗体溶液とを混合し、30℃で1時間インキュベートした後、ゲルろ過(ウルトロゲルAcA44, 0.1M リン酸緩衝液, 0.1M NaCl: pH7)を行ない、抗ディゴキシゲニン抗体と抗ビオチン抗体とを結合してなるリンカー(図3参照)を分取した。

【0047】(2) 蛍光物質含有リポソームの調製
レシチン(1μmol), コレステロール(0.65μmol), ローダミン-DHPE(0.25μmol)及びビオチン-X-DHPE(0.1μmol)を、溶媒としてのクロロホルム5mlに溶解して、ナスフラスコに入れ、よく攪拌した後エバポレータで溶媒を除去した。

【0048】再び、このナスフラスコに、溶媒としてのクロロホルムを3ml入れ、攪拌した後、ロータリーエバポレータで溶媒を除去した。これを3~5回繰り返した。するとフラスコ壁面に薄膜が形成されるので、これを真空デシケーターに移して、1昼夜真空ポンプで真空吸引して溶媒を完全に除去した。調製されたリポソームの表面には、蛍光物質(ローダミン)が共有結合により結合している。

【0049】次いで、フラスコ内部を窒素で置換し、次いで、バッファー(0.1mol/リットル リン酸緩衝液, 5mM EDTA, pH: 6)を5ml加え、約60℃の温水槽に浸した後、バスタイプの超音波処理機で20分間超音波処理をした。するとナスフラスコの壁面から薄膜状のリポソームが剥がれながら、小径リポソームが調製された。

【0050】リポソームサイズを均一化するために、細孔0.2μmのポリテトラフルオロエチレン(PTFE)メンブレンフィルターでろ過することにより、リポ

ソームを押し出し、その径を0.2μm以下にそろえた。得られたリポソームは、3000~4000のレシチンからなる脂質人工膜である。

【0051】(3) 蛍光物質含有リポソームを用いた被検体物質の検出

ポリサイエンス社製のPOLYBEAD, CARBOXYLATOMICROSPHERES(ビーズ)を用い、スライドガラス上で微量のアルカリホスファターゼを検出した。

10 【0052】即ち、まず、抗アルカリホスファターゼ抗体をビーズに固定した。次に、アルカリホスファターゼ(AP)を含む溶液を、1個のビーズに1個のAPが結合する割合で反応させた。更に、ディゴキシゲニン

(D)で標識された抗アルカリホスファターゼ抗体を反応させた。

【0053】次に、過剰の抗アルカリホスファターゼ抗体をTRIS buffer(100mM Tris-HCl, 150mM NaCl; pH7.5)により洗浄した。次いで、上記のリンカー抗体溶液を反応させた後、更に、上記のTRIS bufferにより未反応のリンカー抗体溶液を良く洗浄した。次に、上記の蛍光物質含有リポソームを30分間、反応させ、蛍光を検出した。検出は蛍光顕微鏡(倍率1000倍)で観察を行った。その結果、図2に示すごとく、分散したビーズに結合したと判断される蛍光輝点が検出できた。

30 【0054】1個のリポソームが同じ輝点の大きさに見えた。このことから、1個のビーズに1個のリポソームが結合し、検出できたということになる。つまり、今回のように分散させた標的物質でなくとも、リポソームが結合できる反応基が1個あれば、検出できるということ

で、臨床分野などで、超高感度な検出系といえる。

【0055】実施例2

本例においては、ナイロンメンブレンフィルタを用いて、被検体物質としてのラムダDNAの検出を行った。本例の検出方法の概要について図5を用いて説明すると、まず、固相担体30に被検体物質400を固定した。次に、被検体物質400に、第一ハプテン610を結合させた被検体物質400を結合させた。次に、第一ハプテン610に、抗原抗体反応により、実施例1のリンカー2を介して、蛍光集合体1の第二ハプテン12を結合させ、蛍光集合体1から発する蛍光を検出した。

40 【0056】本例においては、固相担体30はナイロンメンブレンフィルタである。また、第一ハプテン610はディゴキシゲニン、第一抗体成分210は抗ディゴキシゲニン抗体であって、第二ハプテン12はビオチン、第二抗体成分220は抗ビオチン抗体である。蛍光集合体1は、共有結合性蛍光物質としてのローダミンを結合させたリポソーム11である。尚、上記第一抗体成分210と第二抗体成分220とよりなるリンカー2、及び

50 蛍光集合体1は、実施例1と同様のものである。

【0057】以下、上記ラムダDNAの検出方法について詳説する。まず、被検体物質としてラムダDNAをディゴキシゲニン(D)によりラムダDNAを標識し、 $0, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ 分子/spot (非特異的DNAとして 100 ng/ml ニシン精子DNAを含む。)となるように希釈を行ない、ナイロンメンブレンフィルタにスポットし、 50°C で15分間加熱して、固定した。

【0058】ナイロンメンブレンフィルタをブロッッキング処理し、リンカーを反応させ、リンカーの抗ディゴキシゲニン抗体を、ディゴキシゲニンで標識したラムダDNAに結合させた。次に、過剰のリンカーをTRIS bufferにより洗浄して、未反応物を除去した。その後、複数の蛍光物質(ローダミン)を含有するリポソーム11を室温で5時間反応させ、蛍光を検出した。上記リンカー2とリポソーム11は、実施例1と同様に調製したものをを用いた。

【0059】上記蛍光を蛍光顕微鏡(倍率400倍)で観察すると、 10^3 分子のスポットまで輝点として検出できた。この結果より、1分子のラムダDNAが1つの輝点として検出できた。このことから、1個の上記リポソームが、リンカーを介して、ラムダDNAに結合することにより、これを検出できることがわかる。つまり、被検体物質を特異的に検出できる反応系が確立できたといえる。

【0060】実施例3

本例においては、ニトロセルロースフィルタを用いて、被検体物質として、ビオチン化タンパク(抗ウサギ抗体)の検出を行った。本例の検出方法の概要について図6を用いて説明すると、まず、第一ハプテン611を有する被検体物質410を固相担体31に固定する。次に、第一ハプテン611に、抗原抗体反応により、第一抗体成分211と第二抗体成分221とよりなるリンカー20を介して、蛍光集合体1の第二ハプテン121を結合させ、蛍光集合体1から発する蛍光を検出する。

【0061】本例においては、固相担体31はニトロセルロースフィルタである。また、第一ハプテン611はビオチン、第一抗体成分211は抗ビオチン抗体であって、第二抗体成分221は抗ジニトロフェノール抗体、第二ハプテン121はジニトロフェノールである。蛍光集合体1は、共有結合性蛍光物質としてのローダミンを結合させたリポソーム11である。

【0062】以下、上記抗ウサギ抗体の検出方法について詳説する。

(1) リンカーの調製

① 抗ビオチン抗体の修飾

抗ビオチン抗体(ベクター社製)3mgを 0.1 M 酢酸-NaOH緩衝液(pH4.5)で透析し、ペプシン(シグマ社製)0.2mgを加え、 37°C で16時間静置した。沈澱を遠心分離により除去し、その上清をゲル

ろ過(ウルトロゲルAcA44, カラムサイズ: $1.0 \times 45\text{ cm}$, 緩衝液: 0.1 M リン酸pH:7)した。

【0063】抗ビオチン抗体蛋白の溶出画分を集め、硫酸アンモニウムを濃度 0.66 g/ml (重量%)で加え、抗ビオチン抗体を沈澱させた(塩析)。遠心分離後、沈澱をリン酸緩衝液(0.1 mol pH:6) 0.4 ml に溶解し、防腐のため 0.1 g/ml アジ化ナトリウム $4\text{ }\mu\text{l}$ 加え、 F(ab')_2 フラグメント溶液とした。

【0064】 F(ab')_2 フラグメント溶液に、 0.1 M メルカプトエチルアミン塩酸塩(0.1 M リン酸緩衝液 pH:6, 5 mM EDTA) $50\text{ }\mu\text{l}$ を加え、 37°C で90分静置した。ゲルろ過後、可変部単体(Fab')画分を絵詰め、塩析により 0.4 ml に濃縮し、抗ビオチン抗体(Fab')溶液とした。

【0065】上記抗ビオチン抗体(Fab')溶液に、 2 mg/ml 1, 6-bis-maleimido hexaneを 30 ml 加え、 30°C で1時間反応させ、反応物をゲルろ過(Sephadex G-25(カラムサイズ: $1.0 \times 15\text{ cm}$: 0.1 M リン酸緩衝液, 1 mM MgCl_2 , 0.1 M ZnCl_2 , pH7))により精製し、マレイミド化抗ビオチン抗体(Fab')溶液とした。

【0066】② 抗ジニトロフェノール(DNP)抗体の修飾

抗ジニトロフェノール(DNP)抗体(Molecular Probes社製)を①の抗ビオチン抗体の修飾法 Fab' フラグメント画分まで、還元させ、抗DNP抗体(Fab')溶液とした。

【0067】③ 抗ビオチン抗体(Fab')溶液と抗DNP抗体(Fab')溶液の結合反応

①の抗ビオチン抗体(Fab')溶液と②の抗DNP抗体(Fab')溶液とを混合し、 30°C で1時間インキュベートした後、ゲルろ過(ウルトロゲルAcA44, 0.1 M リン酸緩衝液, 0.1 M NaCl ; pH7)を行ない、抗ビオチン抗体と抗DNP抗体とを結合してなるリンカー(図4参照)を分取した。

【0068】(2) 蛍光物質含有リポソームの調製
実施例1で用いたビオチン-X-DEPEの代わりに、 $0.1\text{ }\mu\text{mol}$ のDNPをリポソームに結合させた。その他は、実施例1と同様に蛍光物質含有リポソームを調製した。

【0069】(3) 蛍光物質含有リポソームを用いたタンパクの検出

ビオチンで標識した抗ウサギ抗体を、 $0, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ 分子/spotとなるように希釈を行ない、ニトロセルロースフィルタにスポットし、風乾により固定した。なおこの際全てのスポットが、非特異的物質としての 10^6 分子/spotのBSA(牛血清アルブミン)を含むようにした。

【0070】ニトロセルロースフィルターをブロッキング処理し、次に、リンカーを反応させて、リンカーの抗ビオチン抗体を、ビオチンで標識した抗ウサギ抗体に結合させた。次に、過剰のリンカーをTRIS bufferにより洗浄して、未反応の反応物を除いた後、DNP標識ローダミン含有リボソームを室温で5時間反応させた。

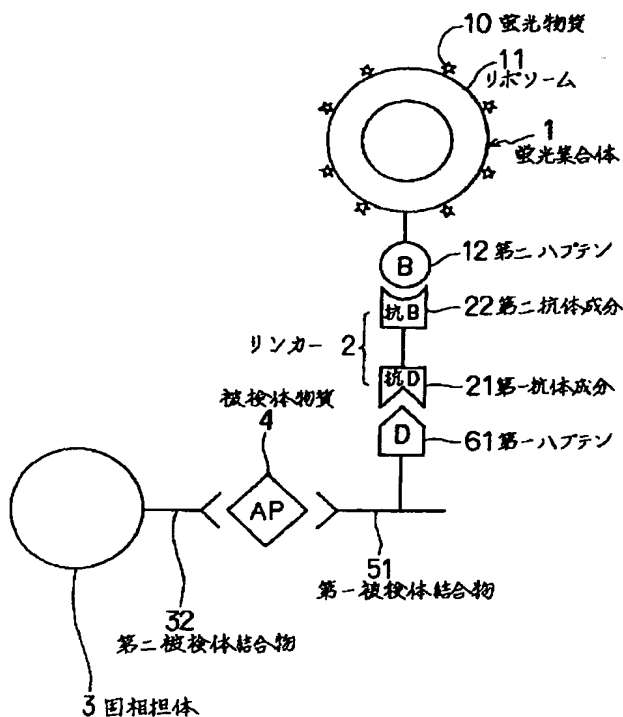
【0071】蛍光顕微鏡で観察すると、 10^4 分子のスポットまで輝点として検出できた。この輝点の数が 10^4 分子確認できることから、1分子の抗ウサギ抗体が1つの輝点として検出できたことになる。このことから、1個の上記リボソームがリンカーを介して抗ウサギ抗体に結合することにより、抗ウサギ抗体を検出できることがわかる。つまり、一分子の被検体物質を特異的に検出できる反応系が確立できたといえる。尚、 10^4 分子以下のスポットについては、フィルターに対するタンパクの吸着能の低下により検出できなかった。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の被検体物質の検出方法を示す概要説明図。

【図2】実施例1において、蛍光集合体により検出されたアルカリホスファターゼの粒子構造を示す蛍光顕微鏡写真（倍率1000倍）による説明図。

【図1】



* 【図3】本発明の、リンカーの第一抗体成分と第二抗体成分との結合状態を示す説明図。

【図4】本発明の、リンカーの第一抗体成分と第二抗体成分との、他の結合状態を示す説明図。

【図5】実施例2の被検体物質の検出方法を示す説明図。

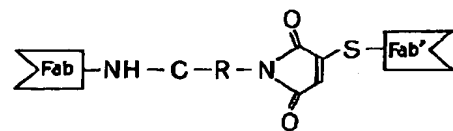
【図6】実施例3の被検体物質の検出方法を示す説明図。

【図7】従来例の問題点を示す説明図。

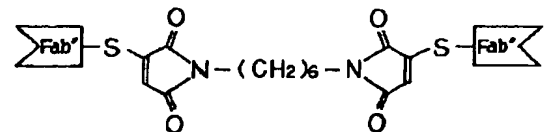
【符号の説明】

- 1... 蛍光集合体,
- 10... 蛍光物質,
- 11... リボソーム,
- 12, 121... 第二ハプテン,
- 2, 20... リンカー,
- 21, 210, 211... 第一抗体成分,
- 22, 220, 221... 第二抗体成分,
- 3, 30, 31... 固相担体,
- 32, 45, 49... 第二被検体結合物,
- 4, 400, 410... 被検体物質,
- 51... 第一被検体結合物,
- 61, 610, 611... 第一ハプテン,

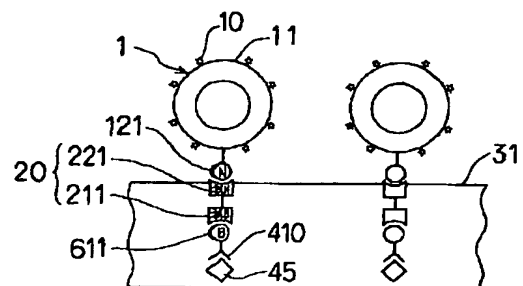
【図3】



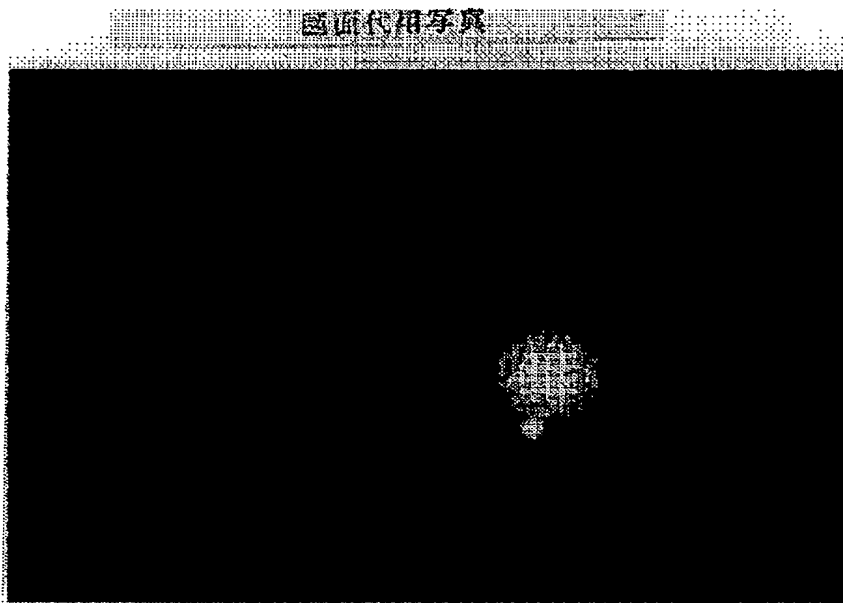
【図4】



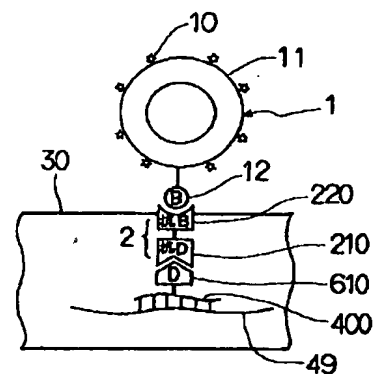
【図6】



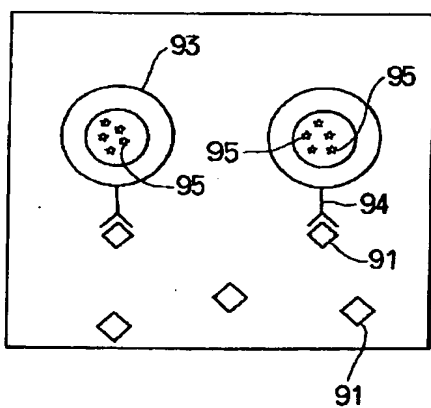
【図 2】



【図 5】



【図 7】



フロントページの続き

(72) 発明者 近藤 恭光
愛知県刈谷市朝日町 2 丁目 1 番地 アイシ
ン精機株式会社内